

基于网络药理学和分子对接探讨益肾通络补气方对少弱精症大鼠雌激素受体的影响

李新阳¹, 孙自学^{2*}

(1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046; 2. 河南省中医院, 河南 郑州 450002)

摘要: **目的** 基于网络药理学和分子对接探讨益肾通络补气方对少弱精症大鼠雌激素受体的影响。**方法** 采用网络药理学和分子对接, 预测益肾通络补气方治疗少弱精症的关键靶点, 考察该方对大鼠睾丸、附睾指数、精子浓度与活力、关键靶点雌激素受体 α (ER α) 蛋白表达的影响。**结果** 共得到 17 个潜在靶点, ER α 在其中起到关键作用。与空白组比较, 模型组大鼠睾丸、附睾脏器指数, 精子浓度与活力降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益肾通络补气方高、中、低组均可不同程度改善大鼠睾丸、附睾脏器指数, 精子浓度与活力 ($P<0.05$)。与空白组比较, 模型组 ER α 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益肾通络补气方低、中、高剂量组 ER α 蛋白表达均增高 ($P<0.01$)。**结论** 益肾通络补气方可通过调节 ER α 表达来达到治疗少弱精子症的作用。

关键词: 益肾通络补气方; 少弱精子症; 雌激素受体; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)11-3216-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2021. 11. 055

目前, 不孕不育已成为全球性的公共问题, 约有 20% 的育龄夫妇受其困扰, 男性因素中的少弱精子症既是男性不育的主要原因之一, 也是诸多生殖健康机构的重要研究课题^[1]。少精子症 (Oligospermia) 是指禁欲 3~5 h 后检查精液, 精子密度小于 $20 \times 10^6/\text{mL}$ ^[2]; 弱精子症 (Asthenospermia) 则是指男性禁欲 2~7 d 后检查精液, 前向运动精子百分率 $<32\%$ 或 (前向运动+非前向运动) 精子百分率 $<40\%$, 且精子浓度 $<15 \times 10^6/\text{mL}$ ^[3], 二者合称少弱精子症, 是引起男性不育最常见的病因之一。男性精子生成障碍是环境因素和遗传因素相互作用的结果, 主要由生殖道感染、内分泌激素紊乱、精索静脉曲张、免疫异常及理化等复杂因素引起^[4]。

《诸病源候论》曰:“丈夫无子者, 其精清如水, 冷如冰铁, 皆为无子之候”。因此, 中医认为少弱精子症与古籍中“精少”“精冷”“精清”类似, 其主要病机多为肾中精气受损, 致肾阴、肾阳平衡失调, 从而形成阴阳俱损的表现。病因由于先天不足、房劳过度、内伤七情、饮食不节等, 影响生殖功能, 故本病治则多以滋阴补阳、补肾填精为主。益肾通络补气方, 由菟丝子、淫羊藿、黄芪、党参、枸杞子、川牛膝、熟地黄等药物组成, 是河南省中医院孙自学教授临床经验方, 具有补肾填精、健脾益气、活血通络之效。运用中医学“肾藏精, 主生殖”“阴为体, 阳为用”理论, 以该方治疗少弱精子症增强其补肾填精疗

效。方中菟丝子、淫羊藿具有补益肾阳、固精缩尿之功效, 黄芪、党参则能固表补中益气, 枸杞子滋肾补肝, 川牛膝逐瘀通络, 熟地黄滋阴补血, 此为益肾通络补气方中主要药物。在现代药理学研究中诸药也具有抗氧化、抑制生精细胞凋亡等作用, 这些对于精子的生成、成熟都具有重要意义^[5]。为进一步研究益肾通络补气方的功效, 本研究拟采用网络药理学方法和分子对接技术, 从分子水平分析益肾通络补气方中有效成分, 预测其作用靶点及相关信号通路, 并设计相关实验进行验证, 以期能阐明益肾通络补气方治疗少弱精子症的作用机制。

1 网络药理学

1.1 药物活性成分筛选及活性成分靶点预测 以“菟丝子”“淫羊藿”“枸杞子”“黄芪”“熟地黄”“党参”“川牛膝”“白术”“陈皮”为关键词, 从中药系统药理学数据库及分析平台^[6] (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) 和中医药整合药理学研究平台^[7] (Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine, TCMIP) 中检索上述 9 味药材的化学成分, 并以生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 、药物相似度 (DL) ≥ 0.18 为标准进行活性成分筛选。

1.2 益肾通络补气方治疗少弱精症相关靶点筛选 以关键词“Oligospermia”“Asthenospermia”在 PharmGkb 数据库

收稿日期: 2020-10-04
基金项目: 国家自然科学基金 (81603632); 河南省中医药科学研究专项课题重大专项 (2018ZYZD10)
作者简介: 李新阳 (1994—), 男, 硕士生, 研究方向为中医药防治男性疾病。Tel: 16638055619, E-mail: lxy1769568364@163.com
*通信作者: 孙自学 (1964—), 男, 硕士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中医药防治不孕不育症、性功能障碍、精囊炎、附睾炎等男科杂病以及泌尿系各种感染性疾病。Tel: (0371) 60908730, E-mail: sunhhzx@163.com

(<https://www.pharmgkb.org/>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中检索,得到少弱精子症相关靶点,并与活性成分靶点与疾病靶点进行匹配,相同靶点即为益肾通络补气方治疗少弱精子症潜在靶点。采用 Cytoscape v3.7.2 软件,构建药物-活性成分-潜在靶点-疾病可视化联系。

1.3 蛋白相互作用网络构建 将益肾通络补气方治疗少弱精子症潜在靶点导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 进行分析,将结果导入 Cytoscape v3.7.2 软件构建网络图,根据 Degree 值进行关键靶点分析。

1.4 基因本体论 (GO) 功能、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析 使用 R 语言软件 3.6.3 版程序包 Cluster Profiler 3.1.2,对益肾通络补气方治疗少弱精子症的潜在靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,设置阈值 $P<0.05$,绘制柱状图与气泡图。

1.5 分子对接 根据“益肾通络补气方-有效成分-靶点-少弱精症”网络与益肾通络补气方治疗少弱精症潜在靶点蛋白互作网络 Degree 值分析结果,KEGG 富集分析结果结合相关文献,发现 ESR1,即雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 为益肾通络补气方治疗少弱精症的核心靶点 (ER α 在 2 个网络中的 Degree 值分别为 19、56)。将 ER α 对应的活性成分根据 Degree 值,筛选出排名前三的活性分子分别为柚皮素 (naringenin)、芒柄花黄素 (formononetin)、川陈皮素 (nobiletin)。

在 PDB 和 PubChem 数据库中,分别获取 ER α 的 PDB 格式文件和 ER α 原配体雷洛昔芬 (raloxifene)、naringenin、formononetin、nobiletin 的 SDF 文件,采用 Pymol 软件对 ER α 蛋白去水、加氢后,利用 Autodock Vina1.1.2 软件进行分子对接。以 ER α 与原配体的结合能为参考,将结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 作为活性成分配体与核心蛋白受体具有较好契合力的筛选标准^[8],结合能越低,结合活性越强,结构越稳定。

2 实验验证

2.1 材料

2.1.1 药物 菟丝子、枸杞子、熟地黄、淫羊藿、黄芪、党参、炒白术、陈皮、川牛膝均由河南省中医院中药房提供,预先加水浸泡 40 min,武火煎煮至沸腾,文火分别浓缩至 5.6、2.8、1.4 g/mL,置于-4℃冰箱至保存。益肾通络补气方临床用量大致为菟丝子 25 g、枸杞子 15 g、熟地黄 15 g、淫羊藿 15 g、黄芪 30 g、党参 15 g、炒白术 15 g、陈皮 12 g、川牛膝 15 g,参照《人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表》换算,得到大鼠等效剂量为 14.13 g/kg。

2.1.2 试剂 注射用环磷酰胺 (批号 9K344A,德国 Baxter Oncology GmbH 公司);兔多抗 ER α (批号 Ab3575,英国 Abcam 公司);兔多抗 GAPDH (批号 AB-P-R001,杭州贤至生物科技有限公司);HRP 标记兔抗羊二抗 (批号 BST12H03A60)、HRP 标记羊抗兔二抗 (批号

BST13L04A54) (武汉博士德生物工程有限公司)。

2.1.3 仪器 恒温水浴箱 (太仓市实验设备厂);AE160 型精密天平秤 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司];BX-51 型生物显微镜 (日本 Olympus 公司);MK-3 酶标仪 (美国 Thermo 公司);蛋白印迹电泳系统 (北京六一仪器厂)。

2.1.4 动物 50 只雄性 SPF 级健康成年 SD 大鼠,体质量 (200 $\pm$ 20) g,购自山西医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK (晋) 2015-000。

2.2 方法

2.2.1 分组与造模 50 只大鼠适应性喂养 1 周后,随机选取 40 只腹腔注射环磷酰胺 35 mg/kg,连续 5 d,建立少弱精症大鼠模型;剩余 10 只腹腔注射等量生理盐水,作为空白组。造模大鼠再随机分为模型组及益肾通络补气方高、中、低剂量组,每组 10 只。

2.2.2 给药 空白组大鼠第 6 天开始,连续 2 周灌胃给予生理盐水;模型组大鼠造模成功后,第 6 天开始连续 2 周灌胃给予生理盐水;益肾通络补气方高、中、低剂量组造模成功后,第 6 天开始连续 2 周分别灌胃给予益肾通络补气方 28、14、7 g/kg (相当于临床剂量的 2、1、0.5 倍)。

2.3 指标检测

2.3.1 睾丸、附睾脏器指数 末次给药 12 h 后,测定各组大鼠体质量,腹腔注射水合氯醛麻醉,取双侧睾丸、附睾,迅速称定质量,同只大鼠脏器质量取双侧平均值,脏器指数 = (脏器质量/体质量) $\times$ 100%。

2.3.2 精液质量 末次给药 12 h 后,腹腔注射水合氯醛麻醉,取附睾,置于 3 mL、37℃生理盐水中,组织剪剪碎,静置 1 min 后 37℃恒温水浴 5 min,轻轻摇晃使精子充分游出与生理盐水混匀,采用 GDYN-SCA 型全自动精子质量分析系统分析精子浓度与活力。

2.3.3 Western blot 检测睾丸 ER α 蛋白表达 提取睾丸组织总蛋白,在-20℃下保存,根据标准蛋白浓度和相应的 OD 值计算直线回归方程,计算样品蛋白浓度,经制胶、电泳、转膜后,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温摇床封闭 2 h,加入 ER α (1:1 000) 一抗,4℃孵育过夜,清洗后加入二抗 (1:50 000),37℃摇床孵育 2 h,清洗多余二抗,ECL 显色,用 BandScan 分析胶片灰度值。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 成分-靶点-疾病网络 从 TC MSP 数据库中根据 OB 与 DL 共筛选得到益肾通络补气方有效成分 120 个,见图 1。在 PharmGkb、GeneCards 数据库中筛选得到 413 个少弱精症靶点,与有效成分对应的 257 个靶点进行匹配,得到 17 个益肾通络补气方治疗少弱精子症的潜在靶点。通过 Cytoscape 软件将“益肾通络补气方-活性成分-靶点-疾病”进行可视化,见图 2~3。

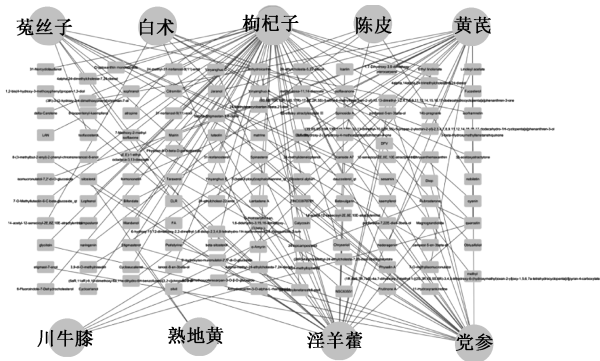


图 1 “中药-有效成分”网络图

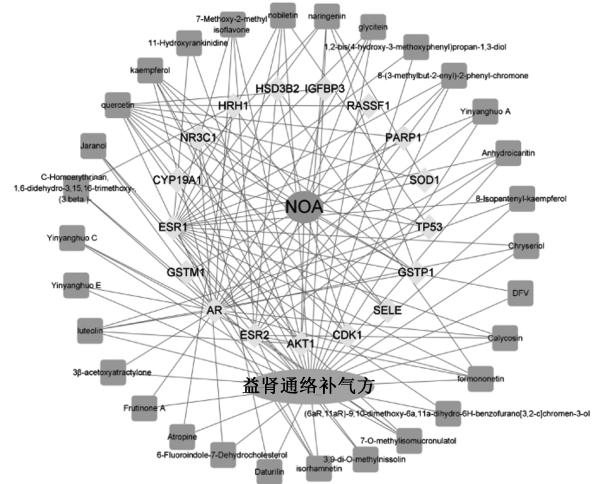


图 2 “益肾通络补气方-有效成分-靶点-少弱精子症”网络图

3.1.2 靶点蛋白互作网络 将 17 个潜在靶点导入 String 数据库分析，并保存结果为 tsv 格式，再将其导入 Cytoscape 软件进行可视化，网络图靶点中面积越大，Degree 值越大，

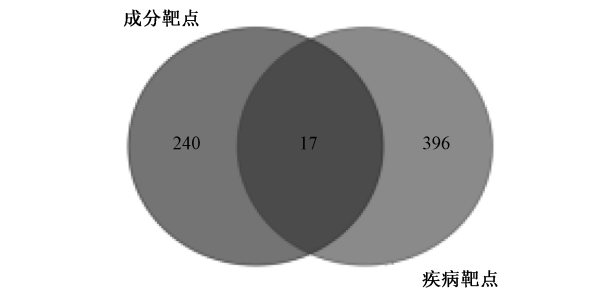


图 3 “益肾通络补气方-少弱精子症”共同靶点交集图

即为在网络中为关键靶点，见图 4。

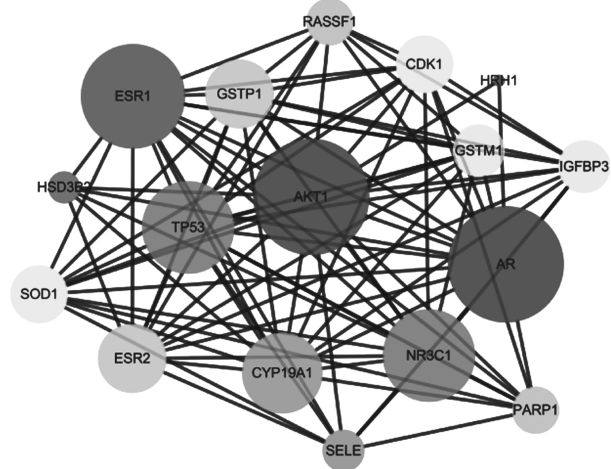


图 4 益肾通络补气方治疗少弱精子症潜在靶点蛋白互作图

3.1.3 GO 功能注释分析及 KEGG 富集分析 GO 功能注释分析结果显示，潜在靶点共富集出 1 002 个条目，涉及生物过程 (BP)、细胞成分 (CC) 和分子功能 (MF) 三个方面，见图 5。KEGG 富集分析结果共得到 37 条通路，见图 6，包含雌激素信号通路、催乳素信号通路、p53 信号通路等。

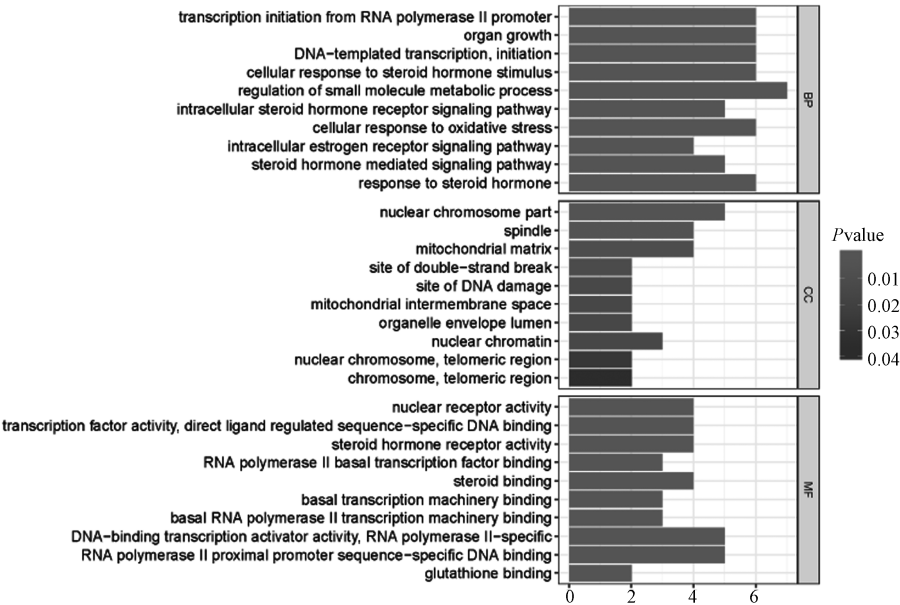
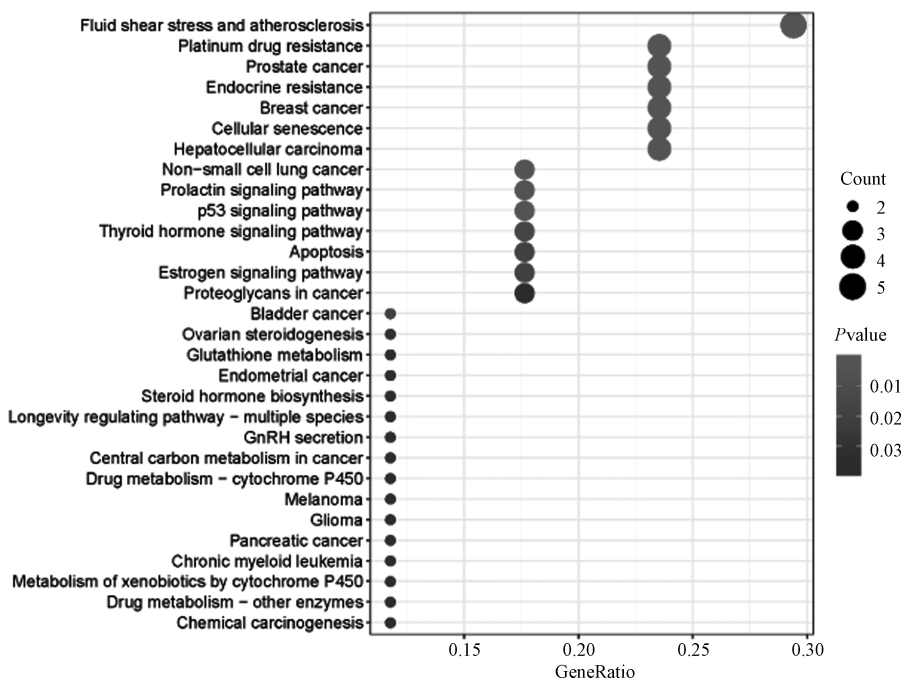
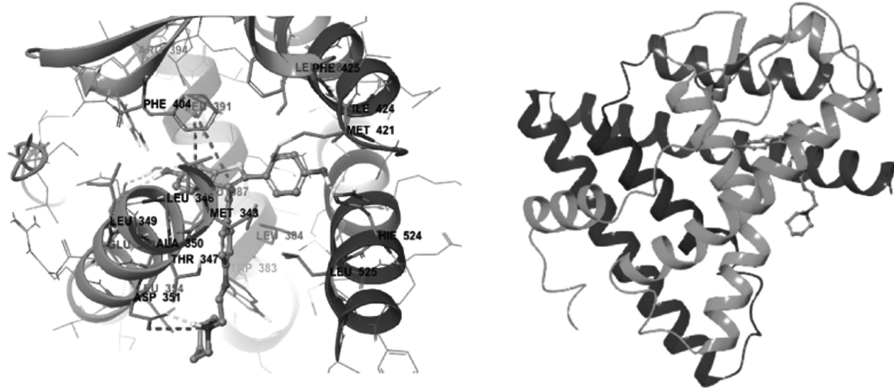


图 5 GO 功能注释分析 (前 10 个条目)



3.1.4 分子对接 ER α 蛋白与其原配体 Raloxifene 的结合能为 -11.8 kJ/mol, naringenin、formononetin、nobiletin 与

ER α 蛋白的结合能分别为-8.4、-7.1、-6.3 kJ/mol, 均具有较好契合力, 见图 7~8。



3.2 实验验证

3.2.1 辜丸、附辜脏器指数 与空白组比较,模型组大鼠辜丸、附辜脏器指数降低 ($P<0.01$);与模型组比较,益肾通络补气方低剂量组大鼠辜丸、附辜指数无明显变化 ($P>0.05$),而中、高剂量组均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),以高剂量组更明显 ($P<0.01$),见图9。

3.2.2 精子浓度与活力 与空白组比较,模型组大鼠精子浓度与活力均下降 ($P<0.01$);与模型组比较,益肾通络补气方低、中、高剂量组大鼠精子浓度与活力均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),以中、高剂量组更为显著 ($P<0.01$),见图 10。

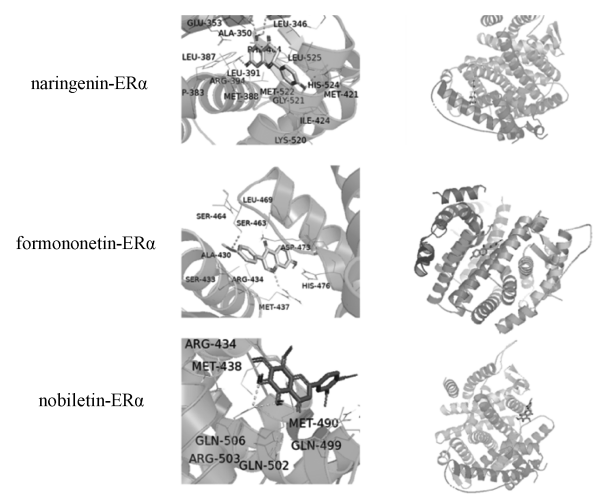
3.2.3 睾丸组织 ER α 蛋白表达 与空白组比较, 模型组大鼠 ER α 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 益肾通

络补气方低、中、高剂量组大鼠 ER α 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$), 见图 11~12。

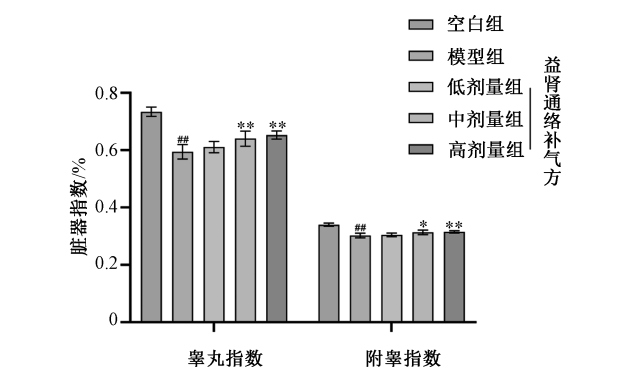
4 讨论

少弱精子症已成为目前男性不育的关注焦点,但其具体病理机制尚未明确。近 50% 的不孕不育夫妇检查后发现男性精液参数存在异常,其中少弱精子症就占 75%^[9]。随着不育男性逐渐增加,严重影响患者的身心健康以及和伴侣的家庭和谐。

中医认为少弱精子症是以肾精亏虚为本,夹杂湿热、血瘀、痰浊、气滞等,本标结合则为该病的基本病机。益肾通络补气方由河南省中医院内制剂,主要用于补肾填精、健脾益气、活血通络,方中主要药物菟丝子、淫羊藿、黄芪、党参、枸杞子、川牛膝、熟地黄都是中药复方中的常

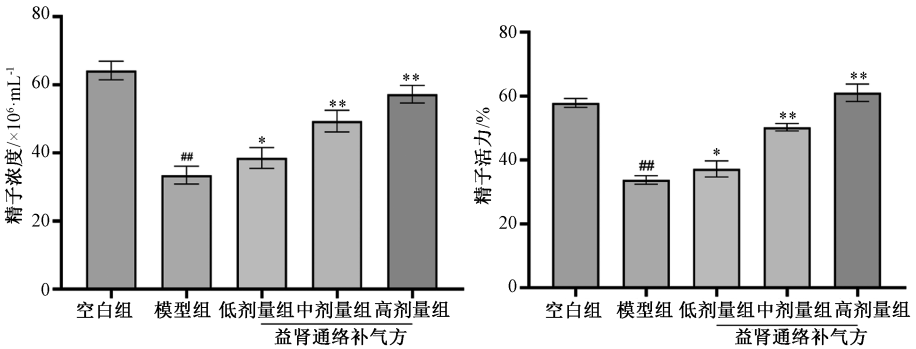


注：左侧为局部图，右侧为整体图。
图 8 柚皮素、芒柄花黄素、川陈皮素与 ERα 对接图



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。
图 9 各组大鼠睾丸、附睾脏器指数 ($n=5$)

用经典药物，临床也应用广泛。研究发现，含有菟丝子、淫羊藿、枸杞子等药物的黄精赞育胶囊可明显改善少弱精子症大鼠睾丸组织形态，提高精子活力和数量，进而促进



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。
图 10 各组大鼠精子浓度、活力 ($n=5$)

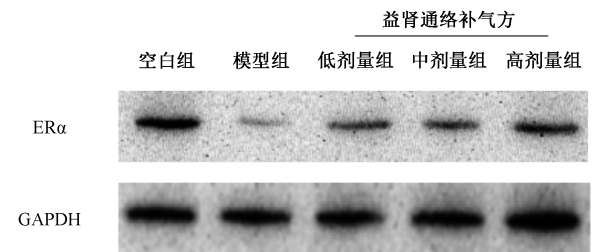
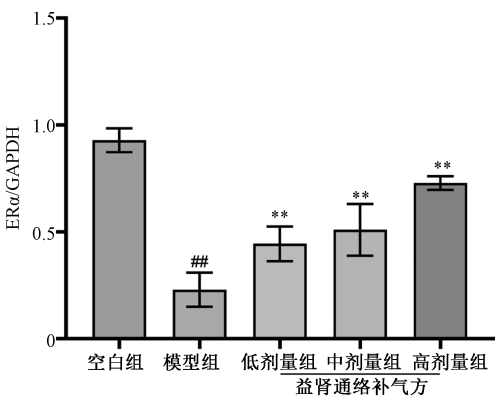


图 11 各组大鼠睾丸 ERα 蛋白表达 (电泳图)



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。
图 12 各组大鼠睾丸 ERα 蛋白表达 ($n=5$)

性腺轴功能恢复^[10]；由李曰庆教授研制含有菟丝子-枸杞子药对的补肾生精丸对腺嘌呤损伤造成的生精损伤大鼠生精细胞具有保护作用，其机制是通过抗氧化作用增强超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、降低一氧化氮合酶 (NOS) 活性；影响一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA) 水平，同时也可抑制细胞凋亡^[11-12]；淫羊藿育宝汤以淫羊藿为君药采用以补肾温阳法可有效改善肾阳亏虚型男性不育患者精液异常状况，从而提升其受孕能力^[13]；黄芪注射液也可通过 ER 发挥疗效^[14]。实验发现，在补肾同时给以活血化瘀药物对少弱精子症也存在一定疗效^[15]。

经过网络药理方法筛选并结合大量文献发现，与益肾通络补气方有效靶点的关联度最高的是雌激素信号通路、

3220

催乳素信号通路、p53 信号通路。研究显示，雌激素在男性生殖中发挥重要作用，且睾丸和精液中含量很高，其受体广泛分布于男性生殖系统睾丸、前列腺等器官中^[16]。ERα 在男性生殖系统中的作用逐渐受到关注，其可通过配体依赖和非依赖途径对男性生殖功能起重要调节作用，可影响精子的发生和成熟^[17]。研究发现，ERα 敲除 (ERαKO) 小鼠模型附睾尾部出现明显精子数量减少，运动活性降低等表现^[18]。通过敲除成年雄性小鼠 ERα 基因后发现，该基

因敲除小鼠睾丸发生萎缩，精子形态明显异常且数目减少、并且生殖能力下降，最终导致不育现象^[19]。雌激素作为生殖系统疾病关键激素，其相关受体 ER α 对于男性不育中少弱精子症也存在重要影响。

通过 GO 富集分析得出，益肾通络补气方中有效成分对应靶点的生物过程及分子功能中，数目最多为小分子代谢过程的调控、细胞对氧化应激的反应、对类固醇激素的反应。其中氧化应激会引起类固醇合成相关酶的活性下降，从而对生殖重要激素——睾酮的合成和代谢产生影响；且睾丸氧化应激损伤同样会导致生精细胞凋亡^[20]。这些靶点均能对生殖相关性腺激素睾酮起调节作用，证实益肾通络补气方对治疗男性不育相关疾病少弱精子症存在一定疗效。

经上述研究并结合分子对接结果显示，ER α 为益肾通络补气方治疗少弱精症的核心靶点。方中活性成分柚皮素、芒柄花黄素、川陈皮素与 ER α 蛋白均具有较好契合力，结合活性强且结构稳定。

为进一步验证益肾通络补气方对少弱精子症作用机制的网络药理学分析结果，本实验研究益肾通络补气方对少弱精子症大鼠睾丸、附睾脏器指数，精子浓度与活力，睾丸组织 ER α 蛋白表达的调控作用进行实验验证。结果发现，益肾通络补气方中、高剂量组睾丸指数、附睾指数、精子浓度与活力表达均呈升高趋势，且以益肾通络补气方高剂量组显著，并且益肾通络补气方低、中、高剂量组还可增高 ER α 蛋白表达。由此推测，益肾通络补气方可通过调控 ER α 表达达到改善精液质量的目的，对少弱精子症具有治疗效果。

综上，益肾通络补气方对少弱精子症具有明确的作用效果。本文基于网络药理学结合相关实验验证，研究益肾通络补气方对少弱精子症的具体作用靶点及机制，为中药复方治疗少弱精子症机制研究提供了方法借鉴，也对临床运用中药复方治疗少弱精子症提供重要理论和实验依据。

参考文献：

[1] 杨 滨, 孟庆宇, 陈 昊, 等. 针药结合治疗少弱精症有效性的 Meta 分析[J]. 针刺研究, 2020, 45(3): 243-250.

[2] 徐晓博. 三个生精障碍的候选基因与少精症关系的初步研究[D]. 大理: 大理学院, 2012.

[3] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册 (第五版) [M]. 谷翊群, 陈振文, 卢文红, 等译. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 17-25.

[4] 杜金明. 126 例男性无精症、少精症相关诱发因素分析[J]. 黑龙江医学, 2015, 39(3): 283-284.

[5] 刘 倩, 田元春, 宾 彬, 等. 菟丝子黄酮对生殖系统的保护作用研究进展[J]. 中医药导报, 2020, 26(12): 148-151; 156.

[6] 刘 朵, 章丹丹, 卞 卡. 地黄药理药化及配伍研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 748-750.

[7] 张亚昊, 方永婷, 崔小梅. 黑果枸杞化学成分和药理作用研究进展[J]. 当代化工研究, 2020(16): 145-147.

[8] Ru J L, Li P, Wang J A, *et al.* TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.

[9] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, *et al.* ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.

[10] 鄢海燕, 邹 妍, 邹纯才. 基于网络药理学和分子对接技术分析清肺排毒汤治疗 COVID-19 的机制 [J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(5): 616-623.

[11] Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, *et al.* European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update [J]. *Eur Urol*, 2012, 62(2): 324-332.

[12] 郑燕飞. 黄精赞育胶囊化学成分及改善少弱精子症的作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.

[13] 杨阿民, 李曰庆, 李海松, 等. 补肾生精丸对生精细胞损伤模型大鼠睾丸组织 NO, NOS 和抗氧化的影响 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 904-906.

[14] 杨阿民, 廖培辰, 宋崇顺, 等. 补肾生精丸对生精细胞损伤模型大鼠生精细胞凋亡与 Bcl-2、Bax、Fas、FasL 表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(7): 470-472; 476; 506.

[15] 周伟强, 张继平, 邵丹丹. 淫羊藿育宝汤对肾阳亏虚型不育症患者精液常规及性激素水平的影响 [J]. 中国性科学, 2014, 23(3): 43-46.

[16] 王海彬, 王军舰, 黄 辉, 等. 黄芪注射液对雌激素受体的激活作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2006 (11): 2113-2115.

[17] 孙建明, 郝建国, 杨振熙, 等. 补肾活血方对特发性少弱精子不育症的精子密度及成活率的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(11): 2233-2234.

[18] 谢晓峰. 甲基苯丙胺对雄性大鼠性腺激素及睾丸雄、雌激素受体的影响 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2019.

[19] 董宇航, 魏金花, 李 臻. 雌激素受体 α 在雄性生殖中的作用 [J]. 生理科学进展, 2014, 45(6): 410-415.

[20] Eddy E M, Washburn T F, Bunch D O, *et al.* Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(11): 4796-4805.